



TITLE:

# 実験的クモ膜下出血におけるイヌ 脳底動脈の力学的性質

AUTHOR(S):

鳴尾, 好人

---

CITATION:

鳴尾, 好人. 実験的クモ膜下出血におけるイヌ脳底動脈の力学的性質. 日本外科宝函 1982, 51(1): 79-92

ISSUE DATE:

1982-01-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208918>

RIGHT:

## 実験的クモ膜下出血におけるイヌ脳底動脈の力学的性質

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導・半田 肇教授）

鳴 尾 好 人

〔原稿受付：昭和56年11月9日〕

## Mechanical property of canine basilar artery in experimental subarachnoid hemorrhage

YOSHITO NARUO

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School  
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

Mechanism of cerebral vasospasm and mechanical properties of constricted arterial walls were studied using cylindrical segments of basilar arteries procured from dogs with experimental subarachnoid hemorrhage (SAH) which was produced by intracisternal injection of fresh autologous blood. Their time related changes in passive arterial wall mechanics, connective tissue composition and response to smooth muscle activation were compared with those from non-treated (control) dogs.

In Krebs-Ringer solution, basilar arteries obtained from the SAH groups demonstrate vasoconstriction, which is most prominent 7 days after SAH. When the smooth muscle is relaxed with saline solution, internal and external radius and wall thickness-radius ratio of the arteries in the SAH groups are almost equal to those in the control group, which suggests that the luminal narrowing produced by SAH, namely cerebral vasospasm, is not caused by irreversible organic change of arterial wall but by some reversible change of smooth muscle contraction.

Under the active condition of smooth muscle component induced by the administration of serotonin  $10^{-5}$  M, the mid-wall diameter response and the active stress of basilar arteries increase chronologically, having their maximum values 7 days after SAH. Passive stress-strain curves of the SAH groups are shifted to the stress axis, and incremental elastic moduli and stiffness parameter,  $\beta$  are lower in the SAH groups than in the control. While both collagen and elastin contents increase continuously after SAH, the elastin content increase earlier and more markedly than the collagen content, which results in the reduction of the collagen to elastin content ratio. This ratio is found to correlate well with the incremental elastic modulus.

Key words: Cerebral aneurysm, Subarachnoid hemorrhage, Cerebral vasospasm, Vascular smooth muscle, Vascular connective tissue.

索引語：脳動脈瘤，クモ膜下出血，脳血管攣縮，血管平滑筋，血管結合組織。

Present address: Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, 54 Shogoin Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

The basilar artery under the condition of experimentally produced cerebral vasospasm is accompanied by the increases in the distensibility of passive components as well as in the contractility of smooth muscle component, which is considered to accelerate the development of the cerebral vasospasm.

## I. はじめに

クモ膜下出血は、脳動脈瘤の破裂による場合がもっとも多く、脳血管障害の約10%を占める<sup>19)</sup>。近年、外科的治療の発達に伴い、その治療成績は著しく向上してきた。しかし、出血後4~8日目に脳底部主幹動脈を中心に強度の血管内腔の狭小化がおり、これが重篤な脳虚血症状などを続発して、患者の予後を不良にする場合が少なくない<sup>6)</sup>。この現象は、1951年、Ecker et al<sup>15)</sup>によって初めて報告されて以来、脳血管攣縮 (cerebral vasospasm) と呼ばれており、現在その臨床的重要性が広く認識されている<sup>31)</sup>。

多くの臨床的・実験的研究により、脳血管攣縮のもっとも根本的な誘因は、クモ膜下腔に凝血塊が存在することであり<sup>19)</sup>、攣縮誘発物質としては、最近特に、赤血球破壊産物<sup>25, 41, 44, 45, 59)</sup>、壁在性プロスタグランジン<sup>19)</sup>が注目されている。しかしながら、未だその本態に関しては不明点が多く、たとえば攣縮血管の内腔狭小化という現象が、少なくともその初期には血管平滑筋の持続的かつ強度な収縮によるものなのか<sup>14, 17, 59)</sup>、中膜壊死や内膜肥厚などの器質的変化によるものなのか<sup>1, 7, 27, 54)</sup>、といった基本的問題すら明確になっていない。また、攣縮血管壁については多くの病理学的研究<sup>7, 16, 24, 27, 54, 57, 58)</sup>がみられるが、その機能的側面を適確に把握しようとした研究は少ない<sup>30)</sup>。

一般に心臓血管系の生理や病態生理は、血行力学的諸因子と血管壁の力学的性質の相互作用によって強く影響されると考えられている<sup>13, 47, 55)</sup>。血管壁は、主に膠原線維や弾性線維などの結合組織と平滑筋とから構成され<sup>4)</sup>、前者は血圧などの外力によって変形を生ずる受動的構成要素、後者はその収縮によってエネルギーを発生する能動的構成要素である<sup>13, 26, 34, 43)</sup>。血管平滑筋の収縮は、受動的構成要素を媒介として、応力の発生あるいは血管径の減少をきたすと考えられている<sup>23, 46)</sup>。従って、どちらの要素の性質が変わっても、血管壁の力学的性質、ひいては循環動態に変化が生ずることが予想される。

Nagasawa et al<sup>38)</sup> は、クモ膜下出血後の脳血管攣縮

を死因とする早期剖検例から得た頭蓋内椎骨動脈の平滑筋を活性化させ、血管収縮を生じた4標本について検討を加えている。それによると、この血管収縮は非クモ膜下出血例に比べて高い内圧レベルまで保持されること、生理的内圧範囲では血管壁の伸展性は著しく減少していることが、攣縮血管壁の変形特性上の特徴であるとしている。しかしながら標本数が少ないため、経時的検討はなされていない。

クモ膜下出血後の脳血管の力学的性質の変化を詳細に調べることを目的として、本研究では実験的にクモ膜下出血を作製した犬の脳底動脈を用いた。血管平滑筋の各種条件下における血管壁の変形特性を *in vitro* で調べ、さらに血管結合組織成分 (コラーゲン, エラスチン) を定量した。これらの結果より、クモ膜下出血時、血管壁の受動的構成要素と能動的構成要素に生じた経時変化、ならびに脳血管攣縮時におけるこれら二要素の力学的相互作用について検討を加えた。

## II. 材料と方法

### 1) 実験操作

#### (i) 実験対象

体重 8~15 kg の雑種成犬 32 頭を、雌雄の区別なく用いた。これらを、次に述べる方法で実験的クモ膜下出血状態 (以下 SAH と略す) を作製した処置群 25 頭と、無処置犬よりなる対照群 7 頭に分類した。

#### (ii) 実験的クモ膜下出血状態 (SAH) の作製

Sodium pentobarbital 20 mg/kg の静脈内麻酔下に気管内挿管を行ない、自発呼吸のもとで腹臥位とし、脳定位固定装置に頭部が約 30 度前屈するように固定した<sup>28)</sup>。22 gauge spinal needle にて、経皮的に環椎後頭骨間より大槽穿刺を行ない、水様透明の髄液を 3~4 ml 排除後、直ちに同量の自家新鮮動脈血をゆっくりと注入した。麻酔覚醒後はケージにて通常の方法で飼育し、SAH 作製より 2 日後 (4 頭)、4 日後 (6 頭)、7 日後 (6 頭)、14 日後 (5 頭)、28 日後 (4 頭) の各時期に以下の実験を行なった。

#### (iii) 内圧-外径測定試験

Sodium pentobarbital 25~35 mg/kg の静脈内麻酔

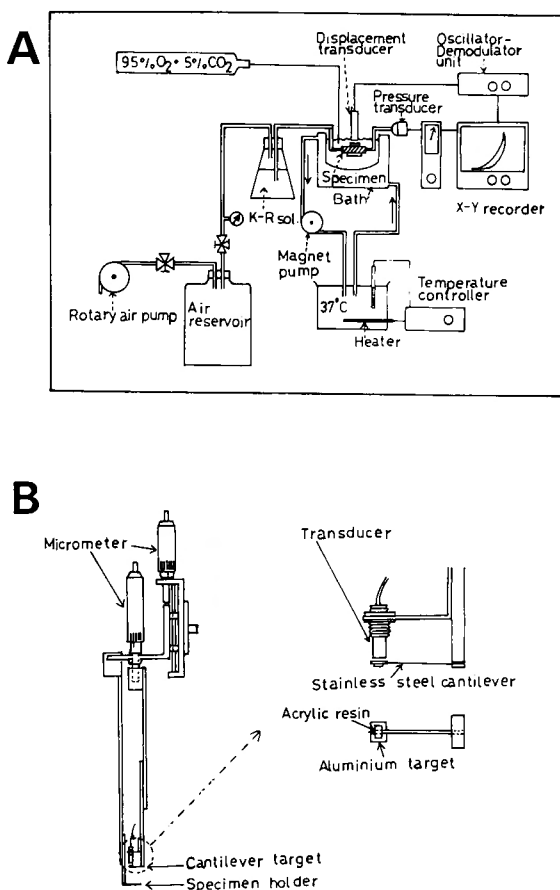


Fig. 1. Schematic diagrams of (A) the testing apparatus and (B) detail of displacement transducer.

にて気管内挿管自発呼吸下，脳定位固定装置に仰臥位で固定し，transcervical and transclival approach にて脳底動脈を露出した．手術用顕微鏡下に，脳底動脈周囲のクモ膜およびクモ膜下血腫をていねいに除去し，各分枝を結紮切断後，長さ約 15～20 mm の円筒状試料として摘出した．これらの手術操作に際しては，血管壁の乾燥防止，損傷防止に細心の注意を払い，また手術侵襲ならびに所要時間が一定となるよう心がけた．摘出に先立って，血管軸方向に 5 mm 間隔で gentian violet の点列をつけ，摘出後の軸方向短縮率測定の指標にした．

摘出後直ちに試料血管内腔の血液を除去し，O<sub>2</sub> 95% + CO<sub>2</sub> 5% 混合ガス還流下，37°C の Krebs-Ringer 液\*（以下 [KRS] と略す）を満たした tissue bath 中に，

生体中の長さになるよう両端を cannulation して固定した．試料血管の一端は加圧装置に接続し，血管内腔へ [KRS] を空気圧で圧送することによって血管内圧の加圧・減圧を行なった．他端は圧変換器に接続し，内圧の測定を行なった (Fig. 1A)．

試料血管の外径の測定には，渦電流損変換型変位計 (Kaman Science Corporation, U.S.A.) を利用した血管径測定装置<sup>33)</sup>を用いた．これは Fig. 1B に示すように，specimen holder と aluminium target をもつ cantilever の間に試料血管をはさみ，aluminium target の変位による渦電流損の値と直進型マイクロメータの値とから外径の測定ができるように設計されている．この cantilever が試料血管におよぼす接触力は 90 mg 以下と小さいため，測定時に血管壁に歪みが生じにく

\* Krebs-Ringer 液: NaCl 115.3 mM, KCl 4.6 mM, CaCl 2.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 22.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1 mM, Glucose 7.8 mM.

いようになっている。この変位計の直線性は、外径変化分としての測定可能域である 0~0.500 mm の範囲内であれば、その誤差が 0.5% 以下と小さい。外径測定装置および圧変換器からの出力は、N・Y 記録計に表示される。

試料血管を、[KRS] 中で内圧 100 mmHg 負荷下、約 30 分間 incubate した。0 mmHg から 250 mmHg の内圧範囲で緩徐な加圧・減圧操作を 3 回繰り返して、生体から摘出した試料血管の負荷と変位の関係を安定化させた<sup>21)</sup>後、1.0 mmHg/sec. の速度で内圧を 0 mmHg から 250 mmHg まで負荷して、内圧-外径曲線を記録した。このようにして得られた内圧-外径曲線は、生体内における血管壁のトーンスを反映していると考えられる。次いで再び内圧を 100 mmHg に保ち、外径が安定した後、tissue bath 中にセロトニンを最終濃度が  $10^{-6}$  M となるように投与した（この溶液を [5HT] と略す）。血管収縮が最大に達したところで内圧を 1.0 mmHg/sec. の速度で 0 mmHg から 250 mmHg まで負荷し、内圧-外径曲線を記録した。この曲線をセロトニンによる平滑筋活性時の曲線とした。最後に試料血管および tissue bath を生理的食塩水 (0.9% NaCl 溶液) ([Saline] と略す) で十分洗滌した後、37°C [Saline] を満した tissue bath 中で血管内腔に [Saline] を圧送して、内圧 100 mmHg 負荷下約 30 分間 incubate した。0 mmHg から 250 mmHg の範囲で加圧・減圧を繰り返し、血管平滑筋のトーンスの影響を除いて安定した再現性のある内圧-外径曲線を記録した。[Saline] 中での内圧-外径曲線は、KC N によって平滑筋のトーンスを完全に除去したときの内圧-外径曲線と同じであることが実験的に確かめられている<sup>56, 61)</sup>ので、これを平滑筋非活性時の曲線とした。

#### (iv) 血管内径の算出

内圧-外径測定試験終了後、内圧負荷に供された部分の試料血管を切りとり、付着水分を十分除去して、無負荷時の試料血管の長さおよび湿重量を測定した。これらの値と、軸方向短縮率ならびに各内圧値における外径の値とから、血管の比重<sup>1.06<sup>11)</sup></sup>、血管壁の非圧縮性<sup>5, 42)</sup>を考慮して計算によって内径を求めた。

#### (v) コラーゲン、エラスチンの定量

各試料血管を細切し、エタノール-エーテル (3:1) 混合液で脱水、脱脂肪の後、脱脂乾燥重量を測定した。98~100°C の 0.1 N NaOH 溶液中で 50 分間加水分解を行ない、コラーゲンとエラスチンを分離し<sup>29, 52)</sup>、それぞれについて 6 N HCl 溶液中で 130°C、3 時間の加

水分解の後、Hydroxyproline を比色定量した<sup>63)</sup>。各 Hydroxyproline 量より、コラーゲン量とエラスチン量を換算し<sup>40)</sup>、単位体積あたりの重量で表示した。

## 2) 内圧-外径曲線の解析

血管壁は一般に内圧負荷に対して非線型の変形挙動をすることが知られており、これを定量的に把握するために種々のパラメータが提唱されてきた<sup>22)</sup>。本研究では、次の(1)および(2)式で表わされるパラメータを用いた。

生理的内圧範囲 (60~160 mmHg) では、圧力比 ( $P_i/P_s$ ) の対数値と膨張比 ( $R_o/R_s$ ) の間に直線関係が成り立つことから、(1)式で与えられる  $\beta$  はスティフネス・パラメータ (Stiffness parameter) と呼ばれ、血管壁の見かけ上の非伸展性を表わす指数として広く使われている<sup>31, 34, 35, 36, 38, 43)</sup>。

$$\ln(P_i/P_s) = \beta(R_o/R_s - 1) \quad (1)$$

ここで  $P_i$  は血管内圧、 $R_o$  は外半径、 $P_s$  は基準内圧 (本研究では  $P_s = 100$  mmHg とした)、 $R_s$  は  $P_s$  時の外半径をそれぞれ表わしている。

前述のように、血管壁は非線型な変形特性を有しているため、血管壁材質の弾性表示には Hooke の法則にもとづく Young 率を用いることができない。しかし Bergel は応力と歪みの微小変化の間には線型関係が成り立つとみなして、増分弾性係数 (Incremental elastic modulus,  $E_{inc}$ ) なるパラメータを提唱した<sup>3)</sup>。これは(2)式で表わされ、応力-歪み曲線の接線の勾配に対応するものである。

$$E_{inc} = \frac{\Delta P_i}{\Delta R_o} \cdot \frac{2(1-\nu^2) \cdot R_i^2 R_o}{R_o^2 - R_i^2} \quad (2)$$

ここで  $\Delta P_i$ 、 $\Delta R_o$  はそれぞれ内圧、外半径の微小範囲における増分であり、 $R_i$  は内半径を表わしている。また Poisson 比  $\nu$  は、血管壁の非圧縮的性質より 0.5 とおくことができる<sup>5, 42)</sup>。

これらのパラメータとは別に、血管内圧によって血管壁に生ずる円周方向の応力 (tangential wall stress:  $\sigma$ ) と歪み (tangential mid-wall strain:  $\epsilon_m$ ) を、(3)および(4)式で求めた<sup>20, 42)</sup>。

$$\sigma = \frac{R_i}{R_o - R_i} \cdot P_i \quad (3)$$

$$\epsilon_m = \frac{R_o + R_i}{r_o + r_i} - 1 \quad (4)$$

ここで、 $r_o$ 、 $r_i$  はそれぞれ平滑筋非活性時の血管内圧 0 mmHg における外半径と内半径である。

血管平滑筋の活性化が血管壁の変形特性におよぼす影響を調べるために、外径変化率 (diameter response:  $\Delta D_m/D_m$ ) および発生応力 (active stress:  $\Delta\sigma$ ) を求めた。

外径変化率  $\Delta D_m/D_m$  は、ある内圧値における平滑筋非活性時の血管径  $D_m$  ( $D_m = R_o + R_i$ ) に対する平滑筋活性化による  $D_m$  の変化分  $\Delta D_m$  の比であり、平滑筋の等圧性収縮 (isobaric contraction) を表わす<sup>8,9,10,11</sup>。

$$\Delta D_m/D_m = \frac{(D_m)_{\text{active}} - (D_m)_{\text{passive}}}{(D_m)_{\text{passive}}} \quad (5)$$

発生応力  $\Delta\sigma$  は、ある歪み値において、平滑筋活性時の応力値と非活性時の応力値の差で表わされ、平滑筋の等尺性収縮 (isometric contraction) を示している<sup>26</sup>。

$$\Delta\sigma = \sigma_{\text{active}} - \sigma_{\text{passive}} \quad (6)$$

### III. 結 果

#### 1) 脳底部肉眼所見

2日後、4日後の処置群では、全例において脳底動脈周囲のクモ膜下腔に凝血塊を認める。7日後または14日後になると凝血塊の量は減少し、28日後には全く消失する。また、14日後および28日後の例では、クモ膜の肥厚がみられるものもある。脳底動脈の内腔には、血栓の付着を認めていない。

#### 2) 内圧-外径曲線

Fig. 2 に各条件下で得られた内圧-外径曲線の典型例を示す。Aは対照群の例、BはSAH 7日後の例である。対照群の例では、[KRS] 中の曲線は [Saline] 中の曲線よりわずかに内圧軸方向に移動しているが、両者はほぼ同じ形状を示している。即ち、低内圧域では伸展性に富んでいるが内圧の増加とともに伸展性が減

少し、下に凸の曲線である。一方、SAH 7日後の例では、[KRS] 中の曲線は [Saline] 中のものより著しく内圧軸方向へ移動し、かつ形状的にも下に凸の程度が減弱し直線的になる。

[5HT] で平滑筋を最大に活性化すると、内圧-外径曲線は [KRS] における場合よりもいっそう内圧軸方向へ移動し、その形状は二相性となる。即ち、ある内圧値 (対照例では約 25 mmHg, SAH 7日後の例では約 180 mmHg) までは、血管径の増加は著しく小さく伸展性に乏しいが、これらの内圧値を越えると急に大きな外径変化をきたし伸展性に富むようになる。この急激な伸展性の変化を生じる内圧-外径曲線上の遷移点は、屈曲点 (flexion point, FP) と呼ばれている<sup>33,34,35,36</sup>。

#### 3) Krebs-Ringer 液中での血管外径の経時変化

対照群および各 SAH 群における、内圧 100 mmHg のときの血管外径を Fig. 3 に示す。SAH 後経時的に外径の減少が認められ、SAH 7日後には最小値となり、これは対照群と比較して有意な外径減少である。SAH 28日後には、ほぼ対照群と等しい外径に復している。

#### 4) 血管平滑筋非活性時の変形特性

##### (i) 血管径および壁厚比

[Saline] で血管平滑筋の収縮状態を解除すると、Fig. 4 に示すように、生理的内圧とみなせる 100 mmHg において、血管外径  $R_o$ 、内半径  $R_i$ 、壁厚比  $T/R_i$  ( $T = R_o - R_i$ ) のそれぞれについては、対照群と SAH 群との間に有意差が認められない。

##### (ii) 応力-歪み曲線

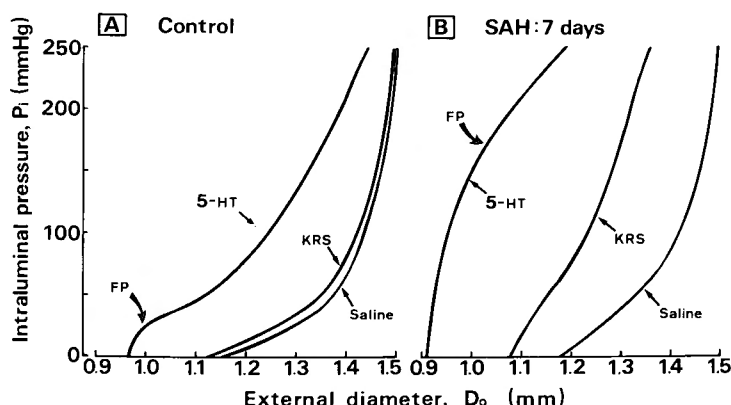


Fig. 2. Examples of pressure-diameter curves of canine basilar arteries from (A) control and (B) SAH groups. SAH: subarachnoid hemorrhage.

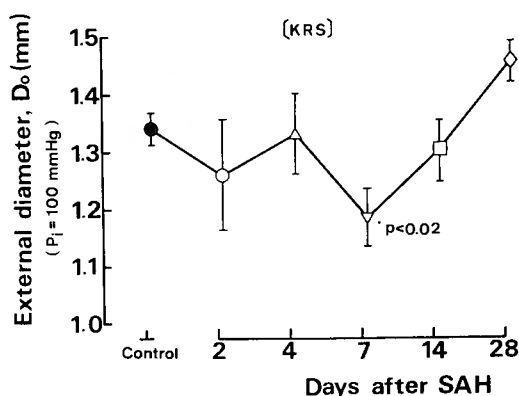


Fig. 3. Changes of external diameter after SAH. Values are expressed as means  $\pm$  SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.

[Saline] 中の内圧-外径曲線より得られた応力-歪み曲線を Fig. 5 に示す。いずれの群においても、下に凸の曲線となり、低応力域では伸展しやすく、応力値の増加とともに硬化する傾向を示す。一定応力値における血管壁の歪みをみると、SAH 2 日後には対照群の約 2 倍になるが、7 日後にはほぼ対照群の値に等しく、その後再び増大して 14、28 日後には対照群の約 1.5 倍となる。

#### (iii) 増分弾性係数およびスティフネス・パラメータ, $\beta$

内圧 100 mmHg における増分弾性係数  $E_{inc}$  の経時変化を Fig. 6 上段に示す。増分弾性係数は、応力-歪み曲線の傾きに対応するもので、血管壁材質そのもの

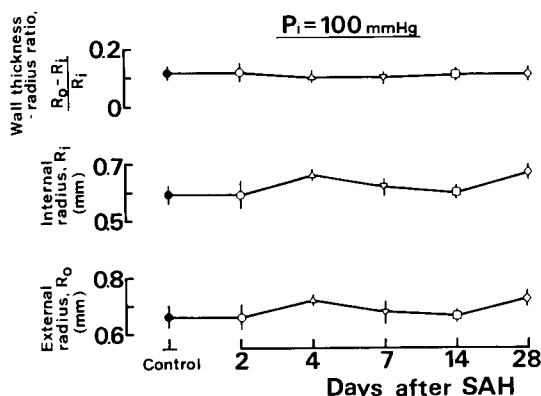


Fig. 4. Changes of dimensions of arterial walls.  $R_o$ : external radius,  $R_i$ : internal radius,  $T/R_i$ : wall thickness-radius ratio. Values are expressed as means  $\pm$  SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.

の弾性を表わしている。この値は、SAH 2 日後に対照群の約 40% にまで減少し、4 日後からは対照群の約 80% の値を維持する。また、内圧 60 mmHg から 160 mmHg の生理的範囲における、血管壁の非伸展性を表わす  $\beta$  値は、Fig. 6 下段に示すように、SAH 2 日後に対照群の約 65% にまで減少するが、その後徐々に増加し、7 日後からは、対照群の約 80% の値で一定化している。

#### 5) 血管平滑筋活性時の変形特性

##### (i) 外径変化率

内圧 100 mmHg における [KRS], [5HT] 各条件下で得られた外径変化率を Fig. 7 に示す。いずれの条件下でも、この値は SAH 後漸増し、7 日後に最大となり、その値は [KRS] 中で 0.14, [5HT] 中で 0.37 である。7 日後からは漸減し、いずれの条件下においても 28 日後には、ほぼ対照群と等しい値となる。なお、[KRS] 中での対照群の外径変化率は、約 0.02 である。

##### (ii) 発生応力

Fig. 8 の実線は、[5HT] 条件下で平滑筋を最大に活

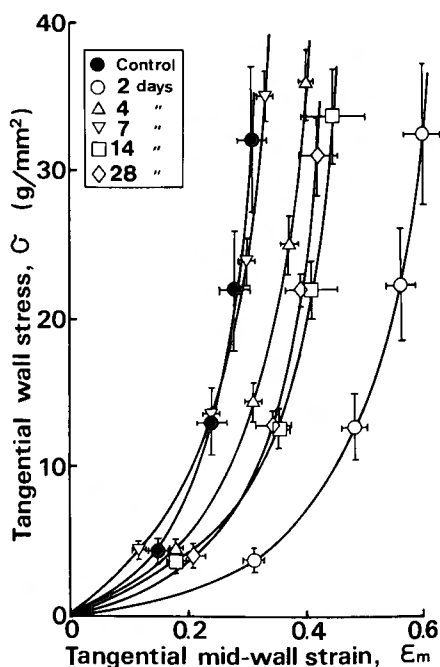


Fig. 5. Relationships between tangential wall stress and tangential mid-wall strain observed under the passive condition of smooth muscle component. Values are expressed as means  $\pm$  SE at every 20 mmHg.

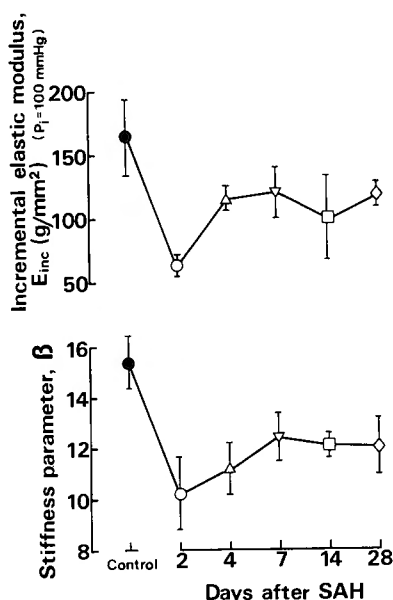


Fig. 6. Changes of incremental elastic modulus (upper) and stiffness parameter (lower) under the passive condition of smooth muscle component. Values are expressed as means  $\pm$  SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.

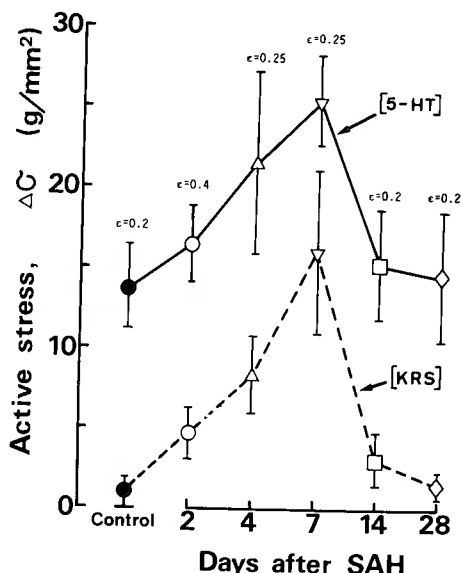


Fig. 8. Changes of active stress after SAH. Solid line represents maximum active stress developed by the administration of  $10^{-5}$  M of serotonin. Broken line represents active stress developed in Krebs-Ringer solution at the same strain level as that at which maximum active stress is developed in serotonin solution. Values are expressed as means  $\pm$  SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.

性化したときに生じる最大発生応力を示す。SAH 後、経時的に増加し、7日後に最大 (約  $25.5 g/mm^2$ ) となり、14、28日後には、ほぼ対照群の値に復す。図中にも示すように、この発生応力が最大となる歪み値は、SAH 2日後には他の時期の約2倍になっている。Fig. 8の破線は、前述の [5HT] 条件下で最大発生応力が生

じる歪み値における、[KRS] 条件下の発生応力を示す。[5HT] 条件下と同様に、[KRS] 中でも発生応力の経時変化は、SAH 7日後までは漸増、以後は漸減し、14~28日後には対照群の値にほぼ復す。

#### 6) コラーゲン量およびエラスチン量

コラーゲン量 (C), エラスチン量 (E), それらの総量 (C+E) およびコラーゲン量とエラスチン量の比 (C/E) を Table 1 にまとめた。C, E ともに SAH 後増加しているが、Fig. 9 に示すように、両者の増加の程度に経時的に差がみられる。即ち、E は SAH 2日後ですでに対照群の約2倍になりその後もひき続いて漸増するが、C の増加は SAH 後早期には緩慢で、7~14日後で対照群の約2倍となる。従って C/E 値は、SAH 2日後には急激に減少 (C/E=1.7) し、対照群の値の約30%になる。その後 C/E 値は徐々に増加し、14~28日後にはほぼ一定 (C/E=3.5) となるが、対照群の値にまでは復さない。また、C+E については SAH 後一定の割合で漸増し、14~28日後には対照群の約2.4倍となる。

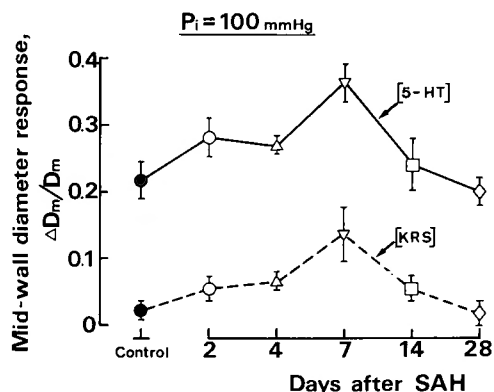
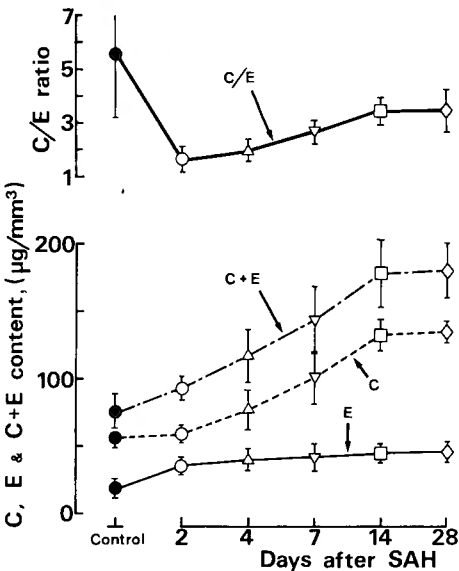


Fig. 7. Changes of mid-wall diameter response after SAH. Values are expressed as means  $\pm$  SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.



**Table 1.** Summary of connective tissue and water contents of basilar arteries in the control and the SAH groups.

Days after SAH	H <sub>2</sub> O ( % of wet wt.)	C		E		C+E		C/E
				(μg/mm <sup>3</sup> )				
Control	72.8±2.6	55.8±	4.1	17.9±	6.4	73.6±	10.1	5.6±2.5
2-days	79.6±1.7	58.4±	4.4	34.9±	3.8	93.3±	6.5	1.7±0.2
4-days	77.3±1.5	77.4±	13.6	39.3±	6.9	116.7±	19.9	2.0±0.2
7-days	77.2±1.0	101.3±	18.5	41.6±	10.0	142.9±	28.3	2.7±0.4
14-days	78.8±2.3	133.1±	8.7	45.2±	7.3	178.3±	24.7	3.5±0.5
28-days	81.4±1.0	135.1±	2.1	46.0±	1.9	181.1±	20.1	3.5±0.8
mean±SE								



**Fig. 9.** Changes of collagen content (C), elastin content (E), total connective tissue content (C+E) and collagen to elastin content ratio (C/E). Values are expressed as means±SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.

**IV. 考 察**

**1) 実験的脳血管攣縮について**

クモ膜下出血に続発する脳血管攣縮に関しては、近年、多くの実験的研究がなされている。実験的クモ膜下出血状態の作製には、観血的に脳底部の小血管を損傷して出血させる方法<sup>3, 16, 32, 53, 60</sup>) か、あるいは、非観血的にクモ膜下腔へ血液を注入する方法<sup>14, 16, 25, 28, 41, 57, 58</sup>) が用いられているが、いずれの方法によっても実験的クモ膜下出血後の脳血管攣縮が、二相性に出現す

る<sup>3, 14, 28</sup>) ことは広く認められており、その出現する時期によりそれぞれ early spasm, late spasm と呼ばれている。臨床的に問題となる脳血管攣縮は、動物実験で認められる late spasm に相当するといわれており、これはクモ膜下出血作製後 3～24 時間で発生し約 1 週間持続するとされている<sup>3</sup>)。本研究では、この late spasm およびそれ以後の時期における脳血管壁の力学的性質を調べる目的で、クモ膜下出血作製 2 日後、4 日後、7 日後、14 日後、28 日後の各時期の脳底動脈を対象とした。

ところで、脳血管攣縮とくに動物実験における late spasm の本態に関しては、種々の研究がなされているが、これらをまとめると次の二つに大別できる。即ち、出血などによる急激な血管平滑筋の収縮に伴って内膜の損傷が生じ、これに続発する内膜の断裂、浮腫、血栓の付着、内膜肥厚および中膜平滑筋細胞の壊死など一連の器質的变化によるものであるとする説<sup>14, 27, 54</sup>) と、クモ膜下腔凝血塊の clotlysis によって溶出してくる諸種の血管作働性物質の経時的推移と血管攣縮のみられる時期との時間的な一致から、これらの物質による血管平滑筋の持続的な収縮であるとする説<sup>14, 17, 59</sup>) である。

本研究では、実験的クモ膜下出血をおこすと脳底動脈の血管径は減少し、SAH 7 日後に最小となった。(Fig. 3)。この結果は、クモ膜下出血により血管攣縮がおこったことを示している。一方、攣縮血管壁の平滑筋の収縮状態を解除すると外径や内径などの血管壁の形状には、有意の変化がみられなかった (Fig. 4)。この事は、実験的クモ膜下出血後の血管攣縮状態で認められる血管壁の形状の変化は、平滑筋の収縮にのみ依存する可逆的なものであり、器質的变化による不可逆的なものではない、ということを意味している。

## 2) クモ膜下出血時の血管平滑筋の収縮性について

クモ膜下出血後の脳底動脈平滑筋の収縮性を調べた報告は多いが、概して血管壁を ring 状や strip 状試料にして等尺性収縮を測定しており<sup>30, 60)</sup>、詳細な材料力学的解析にはいくつかの方法論的問題を内在している<sup>22, 26, 36)</sup>。たとえば、実験開始時に試料に負荷される張力あるいは応力が生理的範囲にあるか否か不明であること、発生する張力や血管収縮は負荷される張力や歪みに依存して変化すること、平滑筋活性時に生じる等尺性張力は必ずしも等圧性収縮とは一致しないこと、さらに本来円筒状である血管を ring や strip 状試料とする操作の影響が明らかになっていないことなどである。本研究では、これらの問題点を解決するため円筒状試料を用い、これから得られた内圧-外径曲線をもとに等圧性収縮および等尺性収縮の両方を測定した。

また、クモ膜下出血後の血管平滑筋の収縮性を調べた研究の結果においては、等尺性収縮が増加するという報告<sup>30)</sup>と減少するという報告<sup>60)</sup>とに分かれ、一致していない。この不一致は、使用動物種の違いによるのかも知れないが、等尺性収縮測定の基準をどの状態におくか、によっても生じると考えられる。即ち、クモ膜下出血後には平滑筋は一定程度収縮しており、この状態を基準にして薬物投与による収縮性を測定するか、あるいは平滑筋弛緩状態を基準にして測定するか、の違いである。現在までになされた研究の多くは、その方法論的な制約により前者の基準に立脚して等尺性収縮を測定している場合が多く、平滑筋を薬物によって活性化する前に、クモ膜下出血によりすでにその血管壁がかなりの程度収縮していれば、見かけ上等尺性収縮は減少して現われるし、逆にクモ膜下出血による収縮が弱ければ、収縮力が増大して現われることになる。本研究では、生理的食塩水にて平滑筋を完全に非活性化した状態を基準にして収縮力を測定しているので、正確な意味での等圧性収縮あるいは等尺性収縮を測定していることになる。

Fig. 7 および Fig. 8 に示したように、[KRS]、[5HT] いずれの条件下においても、外径変化率(等圧性収縮)および発生応力(等尺性収縮)は、クモ膜下出血7日後までは増加し、それ以後は減少してほぼ対照群の値に復している。[KRS] 条件下の対照群の外径変化率(約0.02)は、イヌ脳底動脈がもっている生理的な平滑筋のトーンスを表わしていると考えられる。また [KRS] 条件下の各クモ膜下出血群の外径変化率は、クモ膜下出血によって血管壁に生じた血管収縮、即ち

血管攣縮の程度を表わしていると考えられる。さらに、[5HT] 条件下の最大発生応力は、イヌ脳底動脈の平滑筋の全収縮能を表わしていると考えられ、[5HT] 条件下と [KRS] 条件下における発生応力の差は、攣縮に陥った血管平滑筋の収縮能を表わしていると考えられる。そこで、[KRS] 条件下を基準にして、[5HT] 条件下における外径変化率および発生応力を測定すると、Fig. 10 に示すように、いずれにおいてもクモ膜下出血後有意な経時変化は認められない。このことより、イヌ脳底動脈は、クモ膜下出血によって攣縮状態であっても、セロトニンに対する収縮能には変化をきたさないことがわかる。

## 3) 血管平滑筋非活性時の変形特性と結合組織成分の変化について

Fig. 5 に示した 応力-歪み曲線からも明らかなように、クモ膜下出血によって血管壁の伸展性は著しく変化している。特にクモ膜下出血2日後には、対照群の約2倍の伸展性を有するようになるが、このことは、弾性係数やスティフネス・パラメータの値の低下にも現われている。

弾性係数は、血管壁を構成している材料そのものの

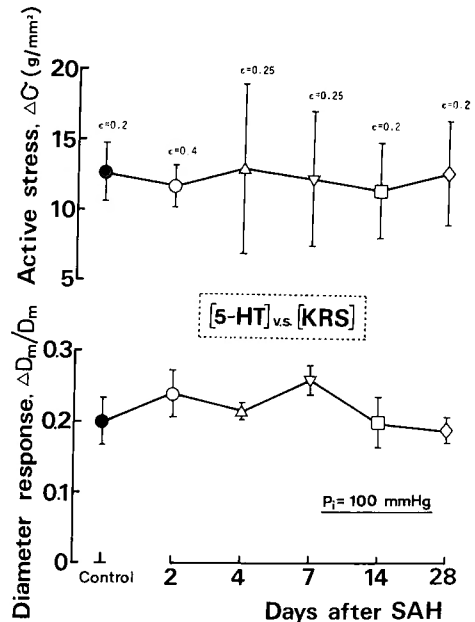


Fig. 10. Changes of active stress (upper) and diameter response (lower) under serotonin solution versus Krebs-Ringer solution after SAH. Values are expressed as means  $\pm$  SE. SAH: subarachnoid hemorrhage.

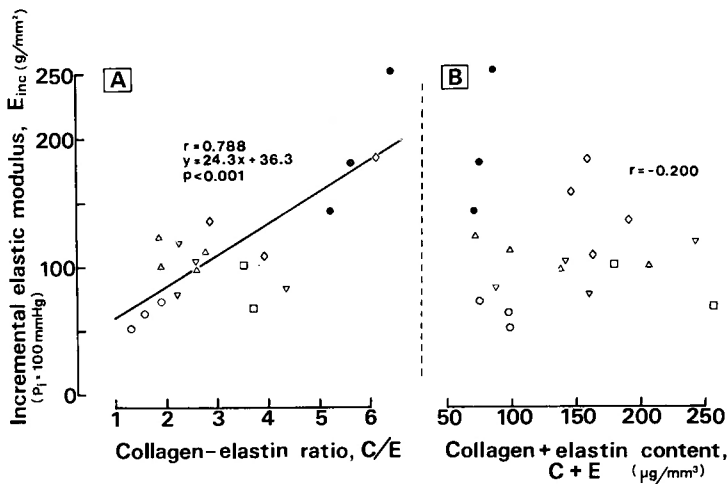


Fig. 11. Correlations of incremental elastic moduli at 100 mmHg with (A) collagen to elastin content ratio (C/E) and with (B) total connective tissue content (C+E).

物性を表わすパラメータであり、応力と歪みの関係を規定するものである<sup>22)</sup>。また、スティフネス・パラメータは、血管壁材質の弾性のみならず、管壁の厚さや径の効果をも含めて血管内圧と径の関係を規定するパラメータであり、必ずしも弾性係数と一致するものではない<sup>22)</sup>。

材料力学的観点より、血管壁の弾性係数とその構成要素との関連性が指摘されている<sup>20, 22)</sup>。血管壁の構成要素を表わす指標としては、コラーゲン量 (C) とエラスチン量 (E) の比 C/E、あるいは、それらの総量 C+E が使われる場合が多い。そこで、内圧 100 mmHg のときの血管壁の弾性係数  $E_{inc}$  と C/E あるいは C+E の値との相関を調べたところ (Fig. 11)、C/E と  $E_{inc}$  との間には、危険率  $p < 0.001$  で有意な相関関係が認められたが、C+E と  $E_{inc}$  との間には、有意な相関関係は認められなかった。これらのことより、血管壁の弾性は結合組織成分の組成に深くかかわっており、それはコラーゲンとエラスチンの総量よりもむしろコラーゲン量とエラスチン量の比によって規定されと考えられる。

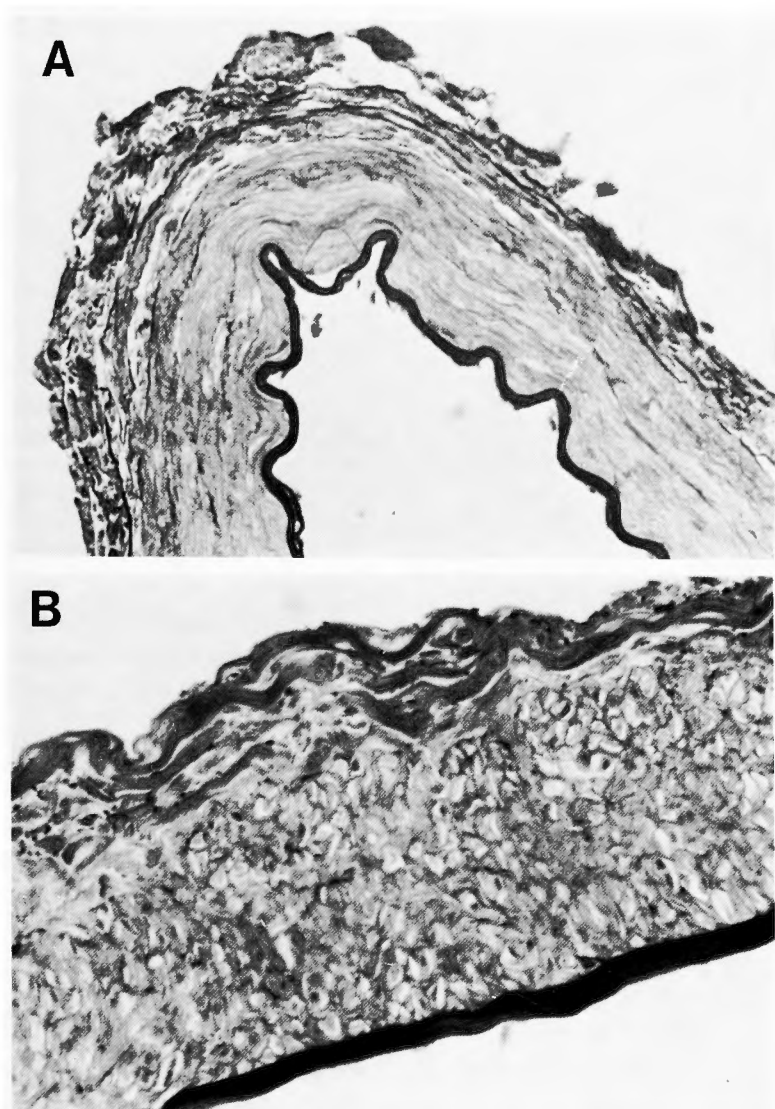
ところで、クモ膜下出血後の血管結合組織成分の変化を定量的に測定した研究はない。本研究では、Fig. 9 に示したように、クモ膜下出血後、コラーゲンとエラスチンの増加を認めた。このような結合組織成分の変化が、どのような形態学的変化として出現しているのかという点については、血管壁の形状の点からも興味深い。しかし、本実験系では、試料血管摘出に際し

て灌流固定法を用いていないため、系統的な形態学的検索は行なわなかった。ただ、内圧-外径測定試験終了直後の試料血管の一部や、剖検脳から得た脳底部主幹動脈について、光顕レベルで観察したところによると、外膜の膠原線維の配列が密になっていること、中膜平滑筋細胞間にところどころ膠原線維や弾性線維の増殖がみられること、内弾性板の厚みが増していること、などが主な所見であった。内膜の著しい肥厚などによる血管内腔狭小化を疑わせる所見および炎症性細胞の滲出は認められなかった (Fig. 12)。

Rutherford et al<sup>50)</sup> は、血小板因子が線維芽細胞や平滑筋細胞を刺激しその増殖を促していることを *in vitro* で証明しており、また Ross et al<sup>48, 49)</sup>、Narayanan et al<sup>39)</sup> は、電顕的ラジオオートグラフィでラット大動脈平滑筋細胞が結合組織蛋白を合成していることを示し、さらに培養血管平滑筋細胞を用いた実験でも microfibril が産生されていることを証明している。これらの実験結果で、本研究でみられたクモ膜下出血後の脳底動脈結合組織成分の増加を説明することができるか否かは明らかでないが、一つの結合組織増殖機転を示唆しているものと思われる。

#### 4) 攣縮血管壁における血管壁弾性と血管平滑筋の収縮効率との関連性

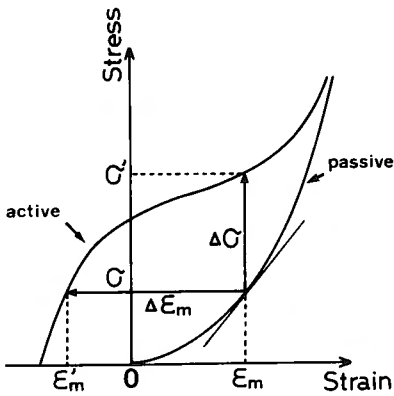
Cox<sup>9, 12)</sup> は、高血圧ラットや老令ラットの総頸動脈を用いた研究で、その血管壁は高血圧や加齢に伴って stiff となり伸展性が低下すること、高血圧ラットでは最大発生応力も最大外径変化率も増加していること、



**Fig. 12.** Microstructure of a canine basilar artery observed 28 days after SAH. (A) transverse section, (B) longitudinal section. Both section were stained with Elastic van Gieson method.

さらに加齢の影響としては最大発生応力は減少するが外径変化率はほとんど不変であること、などを報告している。また Nagasawa et al<sup>37)</sup> は、ヒト頭蓋内および頭蓋外動脈を用いた研究で、平滑筋を活性化すると、最大発生応力は頭蓋内外で差が認められないにもかかわらず、最大外径変化率は頭蓋内動脈の方が有意に大きな値をとることを報告し、頭蓋内動脈には平滑筋活性化がより有効に血管径の減少を生ずる機構の存在を推定している。

ところで、血管平滑筋の収縮は、血管結合組織（主に膠原線維と弾性線維）を媒介として血管径の減少や応力の発生をきたすと考えられている<sup>23, 46)</sup> ので、血管壁の収縮性を考える場合、血管平滑筋の収縮力はもとより血管壁の材質的な力学的性質（たとえば弾性）をも考慮に入れる必要がある。即ち、平滑筋活性化によって発生したエネルギーが、どの程度の血管径の減少をおこすか、といった血管平滑筋の収縮効率には、発生するエネルギー量と血管壁の弾性の両者に依存する



$$\Delta \epsilon_m = \epsilon_m - \epsilon'_m$$

$$\Delta Q = Q - Q'$$

$$\text{Efficacy of V.S.M.} = \frac{\Delta \epsilon_m}{\Delta Q}$$

Fig. 13. Schematic diagram of stress-strain curves under the passive and active conditions.

と推測される。

そこで、Fig. 13 に示すように、応力-歪み曲線上平滑筋が最大に活性化されたときの歪みの変化分  $\Delta \epsilon_m$  が最大となる歪み値を  $\epsilon_m$  とし、この歪み値における発生応力を  $\Delta \sigma$  とすると、両者の比  $\Delta \epsilon_m / \Delta \sigma$  は血管平滑筋の収縮効率を表わす指標と考えられる。この  $\Delta \epsilon_m / \Delta \sigma$  の値と  $\epsilon_m$  における弾性係数  $E_{inc}$  との関係調べると、Fig. 14 に示すように、弾性係数が小さい程平滑筋の収縮効率は高くなる傾向にあり、血管壁の伸展性が增加すればその平滑筋の収縮はより効果的に血管径の減少として現われることがわかる。従って、クモ膜下出血後に認められる血管壁の弾性係数の減少は、平滑筋の発生応力の増加とあいまって、脳血管収縮の進展に促進的に作用しているものと推察される。

## V. ま と め

経皮的な大槽穿刺により実験的クモ膜下出血犬を作製し、その脳底動脈の変形特性ならびに結合組織成分の経時変化を検索し、脳血管収縮の機構および収縮血管壁の力学的特徴を検討した。

1. 摘出直後の脳底動脈は、クモ膜下出血7日後に最大となる血管収縮状態を示し、脳血管収縮を生じている。

2. 生理的食塩水で平滑筋を非活性化すると、この血管収縮は解除され、かつ血管の外径、内径、壁厚比において対照群とクモ膜下出血群との間に有意差はみ

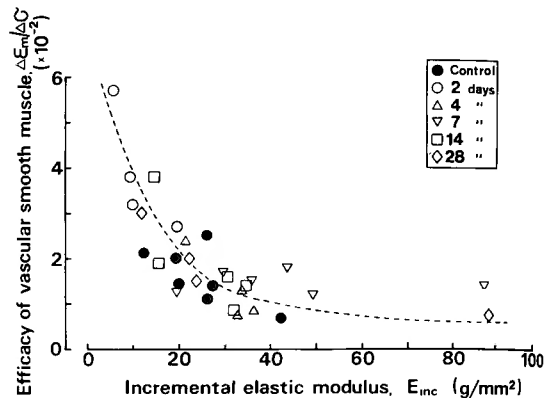


Fig. 14. Relationship between efficacy of vascular smooth muscle and incremental elastic modulus.

られない。従って、血管収縮は平滑筋の収縮による可逆的過程であると考えられる。

3. 平滑筋非活性化状態では、クモ膜下出血後、弾性係数、スティフネス・パラメータともに低下し、脳底動脈は材質的にも見かけ上も伸展性に富むようになる。

4. 平滑筋をセロトニンで活性化すると、外径変化率および最大発生応力ともにクモ膜下出血群で増加しており、7日後に最大となる。クモ膜下出血によって、脳底動脈平滑筋の等圧性および等尺性収縮はともに増大する。

5. 血管壁のコラーゲンとエラスチンは、クモ膜下出血後増加するが、後者の増加の方が早期に著しいため、コラーゲン量とエラスチン量の比は低下する。この比は弾性係数と有意な相関関係にあり、血管壁の弾性を規定する重要な因子であると考えられる。

6. 収縮血管壁における結合組織成分の変化による伸展性の増加は、平滑筋の発生応力の増加とあいまって、脳血管収縮の進展に促進的に作用していると推察される。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った半田 肇教授に深甚なる謝意を表します。また、常に実験に協力して頂き、討論して下さいました京都大学医学部脳神経外科長沢史朗博士、ならびに終始御指導、御鞭撻頂きました国立循環器病センター研究所林絃三郎博士、神鋼病院脳神経外科奥村 厚博士、京都大学医学部脳神経外科森竹浩三博士に深謝致します。さらに、結合組織の定量に関する御教示を頂きました京都大学結核胸部疾患研究所病理部門竹田俊男助教授に感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) Alksne JF, Smith RW: Experimental models of spasm. *Clin Neurosurg* **24**: 216-227, 1977.
- 2) Bergel DH: The static elastic properties of the arterial wall. *J Physiol (London)* **156**: 445-457, 1961.
- 3) Brawley BW, Strandness DE Jr, et al: The biphasic response of cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **28**: 1-8, 1968.
- 4) Burton AC: Physiology and biophysics of the circulation: An introductory text, 2nd ed., Chicago Year Book Med. Pub., 1972.
- 5) Carew TE, Vaishnav RN, Patel DJ: Compressibility of the arterial wall. *Circ Res* **23**: 61-68, 1968.
- 6) Clarisse J, Jomin M, et al: Prognostic significance of cerebral arterial spasm in the course of meningeal hemorrhage. *Neuroradiol* **3**: 150-152, 1971.
- 7) Conway LW, McDonald LW: Structural changes of the intradural arteries following subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **37**: 715-723, 1972.
- 8) Cox RH: Mechanics of canine iliac artery smooth muscle in vitro. *Am J Physiol* **230**: 462-470, 1976.
- 9) Cox RH: Effects of age on the mechanical properties of rat carotid artery. *Am J Physiol* **233**: H256-H263, 1977.
- 10) Cox RH: Comparison of carotid artery mechanics in rat, rabbit and dog. *Am J Physiol* **234**: H280-H288, 1978.
- 11) Cox RH: Differences in mechanics of arterial smooth muscle from hindlimb arteries. *Am J Physiol* **235**: H649-H656, 1978.
- 12) Cox RH: Comparison of arterial wall mechanics in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* **237**: H159-H167, 1979.
- 13) Dobrin PB: Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev* **58**: 397-460, 1978.
- 14) Echlin F: Experimental vasospasm, acute and chronic, due to blood in the subarachnoid space. *J Neurosurg* **35**: 646-656, 1971.
- 15) Ecker A, Riemenschneider PA: Arteriographic demonstration of spasm of the intracranial arteries, With special reference to saccular arterial aneurysms. *J Neurosurg* **8**: 660-667, 1951.
- 16) Fein JM, Flor WJ, et al: Sequential changes of vascular ultrastructure in experimental cerebral vasospasm, Myonecrosis of subarachnoid arteries. *J Neurosurg* **41**: 49-58, 1974.
- 17) Fox JL: Intracranial vasospasm: a study with iron compounds. *Surg Neurol* **11**: 363-368, 1979.
- 18) 半田 肇: 脳神経外科. 第6版, 永井書店, 昭和50年.
- 19) 半田 肇, 岡本新一郎: 血管攣縮の発生機転—脳血管—. *臨床科学* **17**: 61-66, 1981.
- 20) 林 紘三郎, 半田 肇ら: バイオメカニクスの基礎としての血管壁の力学的性質. *材料* **20**: 1001-1011, 1971.
- 21) 林 紘三郎, 佐藤正明ら: 血管壁のバイオメカニクスの研究(三種類の動脈壁の変形挙動と組織観察) *材料* **21**: 1030-1036, 1972.
- 22) Hayashi K, Handa H, et al: Stiffness and elastic behavior of human intracranial and extracranial arteries. *J Biomechanics* **13**: 175-184, 1980.
- 23) Hoffman AS, Grande LA: Sequential enzymolysis of human aorta and resultant stress-strain behavior. *Biomater Med Device Art Org* **5**: 121-145, 1977.
- 24) Hughes JT, Schianchi PM: Cerebral arterial spasm. a histological study at necropsy of the blood vessels in case of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **48**: 515-525, 1978.
- 25) 伊藤昌徳: 脳血管攣縮の実験的研究—OxyHb, FDP, 赤血球膜分解産物の攣縮能と治療法の開発—. *神経外科* **20**: 225-236, 1980.
- 26) Johanson B: Determination of vascular reactivity. *Fed Proc* **33**: 121-126, 1974.
- 27) 金 弘, 水上公宏ら: いわゆる脳血管攣縮の病理学的研究. *神経外科* **16**: 115-125, 1976.
- 28) Kuwayama A, Zervas NT, et al: A model for experimental cerebral arterial spasm. *Stroke* **3**: 49-56, 1972.
- 29) Lansing AI, Rosenthal TB, et al: The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec* **114**: 555-575, 1952.
- 30) Lobato RD, Marin J, et al: Cerebrovascular reactivity to noradrenaline and serotonin following experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **53**: 480-485, 1980.
- 31) 森竹浩三: 脳動脈瘤の成因ならびに増大, 破裂機序に関するバイオメカニクスの研究. *日外宝* **44**: 87-123, 1975.
- 32) Nagai H, Suzuki Y, et al: Experimental cerebral vasospasm, Part I: Factors contributing to early spasm. *J Neurosurg* **46**: 296-303, 1977.
- 33) 長沢史朗, 奥村 厚ら: 小・細血管径測定用変位計の考案, *医器学* **49**: 292-296, 1979.
- 34) 長沢史朗, 鳴尾好人ら: イヌ大腿動脈平滑筋の力学的性質, *脈管学* **20**: 221-226, 1980.
- 35) 長沢史朗, 鳴尾好人ら: イヌ伏在動脈平滑筋の力学的性質, *脈管学* **20**: 313-320, 1980.
- 36) 長沢史朗: ヒト脳血管のバイオメカニクスの研究. *日外宝* **49**: 620-636, 1980.

- 37) Nagasawa S, Handa H, et al: Mechanical properties of human cerebral arteries, Part I: Effects of age and vascular smooth muscle activation. *Surg Neurol* **12**: 297-304, 1979.
- 38) Nagasawa S, Handa H, et al: Mechanical properties of human cerebral arteries, Part II: Vasospasm. *Surg Neurol* **14**: 285-290, 1980.
- 39) Narayanan AS, Sandberg LB, et al: The smooth muscle cell III, elastin synthesis in arterial smooth muscle cell culture. *J Cell Biol* **68**: 411-419, 1976.
- 40) Neuman RE, Logan MA: The determination of collagen and elastin in tissue. *J Biol Chem* **186**: 549-559, 1950.
- 41) 野中利彦: 脳血管攣縮の治療に関する実験的ならびに臨床的研究. *日外会誌* **78**: 359-375, 1977.
- 42) 岡 小天: レオロジー—生物レオロジー—. 裳華房, 昭和51年.
- 43) 奥村 厚: 血管平滑筋の変形特性に関する実験的研究. *日外宝* **46**: 244-257, 1977.
- 44) Osaka K: Experimental studies on cerebrovascular spasm in cats. *Arch Jap Chir* **38**: 349-371, 1969.
- 45) Osaka K: Prolonged vasospasm produced by the breakdown products of erythrocytes. *J Neurosurg* **47**: 403-411, 1977.
- 46) Park JB, Hoffman AS: Interaction of collagen and smooth muscle cells in aortic biomechanics. *Annals Biomed Engineering* **6**: 167-171, 1978.
- 47) Pate DJ, Vaishnav RN: Basic hemodynamics and its role in disease processes. Univ. Prak Press 1980.
- 48) Ross R, Klebanoff SJ: The smooth muscle cell I, in vivo synthesis of connective tissue proteins. *J Cell Biol* **50**: 159-171, 1971.
- 49) Ross R: The smooth muscle cell II, growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* **50**: 172-186, 1971.
- 50) Rutherford RB, Ross R: Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasm serum to proliferate. *J Cell Biol* **69**: 196-203, 1976.
- 51) Saito I, Ueda Y, Sano K: Significance of vasospasm in the treatment of ruptured intracranial aneurysms. *J Neurosurg* **47**: 412-429, 1977.
- 52) Shikata J, Sanada H, et al: Experimental studies of the elastic fiber of the capsular ligament: influence of aging and sex hormones on the hip joint capsule of rats. *Connective Tissue Res* **7**: 21-27, 1979.
- 53) Simeone FA, Ryan KG, et al: Prolonged experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg* **29**: 357-366, 1968.
- 54) Someda K, Morita K, et al: Intimal change following subarachnoid hemorrhage resulting in prolonged arterial luminal narrowing. *Neurol Med Chir* **19**: 83-94, 1979.
- 55) Stehbens WE: Hemodynamics and the blood vessel wall. Charles C. Thomas Pub. 1979.
- 56) 平 修二, 林紘三郎ら: 血管壁のバイオメカニクス研究 (有限要素法による血管壁の応力解析) 材料 **23**: 437-443, 1974.
- 57) Tanabe Y, Sakata K, et al: Cerebral vasospasm and ultrastructural changes in cerebral arterial wall, an experimental study. *J Neurosurg* **49**: 229-238, 1978.
- 58) Tani E, Yamagata S, et al: Intercellular granules and vesicles in prolonged cerebral vasospasm. *J Neurosurg* **48**: 179-189, 1978.
- 59) 谷島健生, 佐野圭司: ヘモグロビンの脳血管収縮能に関する研究 (第1報) —脳血管攣縮との関連において—. *神経外科* **20**: 481-487, 1980.
- 60) Toda N, Ozaki T, Ohta T: Cerebrovascular sensitivity to vasoconstricting agents induced by subarachnoid hemorrhage and vasospasm in dogs. *J Neurosurg* **46**: 296-303, 1977.
- 61) Torrance HB, Schwatz S: The elastic behavior of the arterial wall. *J Roy Coll Surg Edinburgh* **7**: 55-60, 1961.
- 62) Wilkins RH, Levitt P: Intracranial arterial spasm in the dog. A chronic experimental model. *J Neurosurg* **33**: 260-269, 1970.
- 63) Woesnner JF: The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* **93**: 440-447, 1961.